

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of
DEAV2002/0069 US NP

Examiner:

Group Art Unit.: 1646

Application No.: **10/696,011**

Filed: **October 29, 2003**

Title: **CRYSTALS OF INSULIN ANALOGS AND
PROCESSES FOR THEIR PREPARATION**

CERTIFICATE OF MAILING (37 CFR 1.8a)

I hereby certify that this paper (along with any referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to the: Commissioner for Patents, P. O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Date of Deposit

12-13-04

Generia Walker

(Type or print name of person mailing paper)

Generia Walker

(Signature of person mailing paper)

Commissioner for Patents
P. O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

**SUBMISSION AND REQUEST FOR ENTRY
OF PRIORITY PAPERS 37 C.F.R. § 1.55(a)**

Applicants submit herewith certified copy of Germany application, 102 50 297.8, filed on October 29, 2002, for which priority is claimed in the above-identified application.

This submission and request for entry is being made to satisfy the requirements under 35 U.S.C. § 119. Please note that no fees are associated with the entry of the priority documents since they are being timely submitted prior to the date the issue fee is due.

Respectfully submitted,

Barbara E. Kurys

Barbara E. Kurys, Reg. No. 34,650

Attorney/Agent for Applicant

Aventis Pharmaceuticals Inc.
Patent Department
Route #202-206 / P.O. Box 6800
Bridgewater, New Jersey 08807-0800
Telephone (908) 231-2965
Telefax (908) 231-2626

Aventis Docket No. DEAV2002/0069 US NP

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 50 297.8

Anmeldetag: 29. Oktober 2002

Anmelder/Inhaber: Aventis Pharma Deutschland GmbH,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Kristalle von Insulinanaloge und Verfahren zu ihrer
Herstellung

IPC: C 07 K, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 12. Mai 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wehner

Beschreibung

5 Kristalle von Insulinanaloga und Verfahren zu ihrer Herstellung

Die Erfindung betrifft Kristalle eines Insulinanalogons, in welchem Asparagin (Asn) in Position B3 der B-Kette durch einen natürlich auftretenden basischen

Aminosäurerest ausgetauscht ist und wenigstens ein Aminosäurerest in den

10 Positionen B27, B28 oder B29 der B-Kette durch einen anderen natürlich auftretenden neutralen oder sauren Aminosäurerest ausgetauscht ist, wobei

● fakultativ Phenylalanin (Phe) in Position B1 der B-Kette fehlen kann, wobei die Kristalle in der Raumgruppe R3 (Nr. 146) mit den Zellachsen $A=81,5 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ und $C=33,3 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ vorliegen.

15

Weltweit leiden etwa 120 Mio. Menschen an Diabetes mellitus. Darunter sind etwa 12 Mio. Typ I-Diabetiker, für die die Applikation von Insulin die einzig derzeit mögliche Therapie darstellt. Die Betroffenen sind lebenslang, in der Regel mehrmals

20 täglich, auf Insulininjektionen angewiesen. Obgleich Typ II-Diabetes, an dem etwa 100 Mio. Menschen leiden, nicht grundsätzlich mit einem Mangel an Insulin einhergeht, wird doch in einer Vielzahl von Fällen die Behandlung mit Insulin als günstigste oder einzig mögliche Therapieform angesehen.

● Mit fortschreitender Dauer der Krankheit leidet eine große Zahl der Patienten an sogenannten diabetischen Spätkomplikationen. Es handelt sich dabei im

25 wesentlichen um mikro- und makrovaskuläre Schädigungen, die je nach Art und Umfang Nierenversagen, Erblindung, Verlust von Extremitäten oder ein erhöhtes Risiko für Herz/Kreislaufferkrankungen zur Folge haben.

Als Ursache werden in erster Linie chronisch erhöhte Blutglucosespiegel verantwortlich gemacht, da auch bei sorgfältiger Einstellung der Insulintherapie ein

30 normales Blutglucoseprofil, wie es der physiologischen Regulation entsprechen würde, nicht erreicht wird (Ward, J. D. (1989) British Medical Bulletin 45, 111-126; Drury, P.L. et al. (1989) British Medical Bulletin 45, 127-147; Kohner, E.M. (1989) British Medical Bulletin 45, 148-173)

Beim Gesunden ist die Insulinsekretion eng an die Glucosekonzentration des Blutes angelehnt. Erhöhte Glucosespiegel, wie sie nach den Mahlzeiten auftreten, werden durch eine gesteigerte Insulinfreisetzung rasch kompensiert. Im nüchternen Zustand sinkt der Plasmainsulinspiegel auf einen basalen Wert ab, der ausreicht, eine kontinuierliche Versorgung insulin sensitiver Organe und Gewebe mit Glucose zu gewährleisten. Eine Optimierung der Therapie, die sogenannte intensivierte Insulintherapie, zielt heute primär darauf ab, Schwankungen der Blutglucosekonzentration, speziell Entgleisungen nach oben, möglichst gering zu halten (Bolli, G. B. (1989) Diabetes Res. Clin. Pract. 6, S3-S16; Berger, M. (1989) Diabetes Res. Clin. Pract. 6, S25-S32). Dies führt zu einer signifikanten Verminderung des Auftretens und des Fortschreitens diabetischer Spätschäden (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) N. Engl. J. Med. 329, 977-986).

Aus der Physiologie der Insulinsekretion läßt sich ableiten, daß für eine verbesserte, intensivierte Insulintherapie unter Verwendung subcutan applizierter Präparate zwei Insulinzubereitungen mit unterschiedlicher Pharmakodynamik benötigt werden. Zur Kompensation des Blutglucoseanstiegs nach den Mahlzeiten muß das Insulin rasch anströmen und darf nur einige Stunden wirken. Zur basalen Versorgung, insbesondere in der Nacht, sollte ein Präparat zur Verfügung stehen, das lange wirkt, kein ausgeprägtes Maximum aufweist und nur sehr langsam anströmt.

Die auf humanen und tierischen Insulinen basierenden Präparate erfüllen die Ansprüche einer intensivierten Insulintherapie jedoch nur begrenzt. Rasch wirksame Insuline (Alt-Insuline) gelangen zu langsam ins Blut und an den Wirkort und weisen eine zu lange Gesamtwirkdauer auf. Die Folge ist, daß die postprandialen Glucosespiegel zu hoch liegen und mehrere Stunden nach der Mahlzeit die Blutglucose zu stark absinkt (Kang, S. et al. (1991) Diabetes Care 14, 142-148; Home, P.J. et al. (1989) British Medical Bulletin 45, 92-110; Bolli, G. B. (1989) Diabetes Res. Clin. Pract. 6, S3-S16). Die verfügbaren Basalinsuline wiederum, vorallem NPH-Insuline, weisen eine zu kurze Wirkdauer auf und besitzen ein zu stark ausgeprägtes Maximum.

Neben der Möglichkeit, das Wirkprofil über galenische Prinzipien zu beeinflussen, bietet sich mit Hilfe der Gentechnik heute die Alternative, Insulinaloga zu entwerfen, die bestimmte Eigenschaften wie Wirkungseintritt und -dauer allein durch ihre strukturellen Eigenschaften erzielen. Durch die Verwendung geeigneter

5 Insulinaloga könnte daher eine wesentlich bessere, den natürlichen Verhältnissen enger angegliche Einstellung der Blutglucose erreicht werden.

Insulinaloga mit beschleunigtem Wirkungseintritt werden in EP 0 214 826, EP 0 375 437 und EP 0 678 522 beschrieben. EP 0 214 826 bezieht sich u.a. auf

10 Substitutionen von B27 und B28, jedoch nicht in Verbindung mit der Substitution von B3. EP 0 678 522 beschreibt Insulinaloga die in der Position B29 verschiedene Aminosäuren, vorzugsweise Prolin, aufweisen, jedoch nicht Glutaminsäure. EP 0 375 437 umfaßt Insulinaloga mit Lysin oder Arginin in B28, die optional zusätzlich in B3 und/oder A21 modifiziert sein können. In EP 0 885 961 A1 wird B3-

15 Lysin, B29-Glutamat-Humaninsulin als neues, schnellwirkendes Insulin offenbart.

In der EP 0 419 504 werden Insulinaloga offenbart, die gegen chemische Modifikationen geschützt sind, indem Asparagin in B3 und wenigstens eine weitere Aminosäure in den Positionen A5, A15, A18 oder A21 verändert sind. Die hier

20 beschriebenen Insulinaloga weisen jedoch nur eine Modifikation in der Position B3 und keine weitere aus der erwähnten Gruppe auf. Ein Hinweis, daß diese Verbindungen eine veränderte Pharmakodynamik mit der Folge eines schnelleren Wirkungseintritts besitzen, ist nicht gegeben.

25 Insulinaloga sind Analoga von natürlich vorkommenden Insulinen, nämlich Humaninsulin oder tierischen Insulinen, welche sich durch Substitution wenigstens eines natürlich auftretenden Aminosäurerestes und/oder Addition wenigstens eines Aminosäurerestes und/oder organischen Restes von dem entsprechenden, ansonst gleichen natürlich vorkommenden Insulin unterscheiden.

30 Die A-Kette von Humaninsulin weist dabei die folgende Aminosäuresequenz auf: Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn (SEQ ID NO 1)

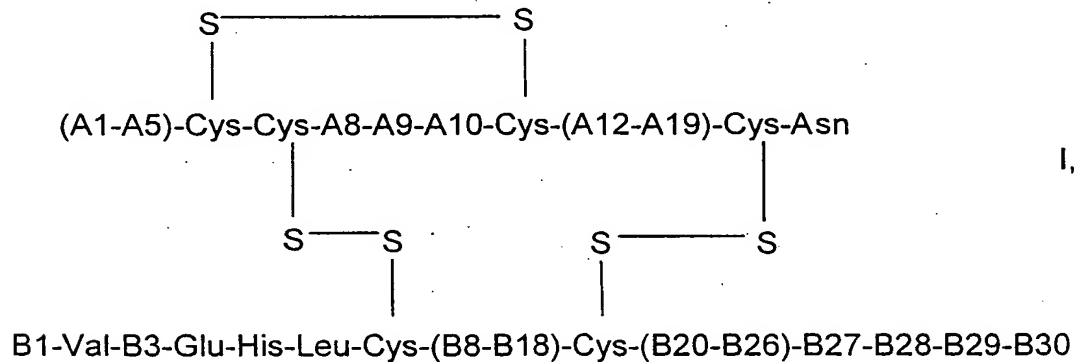
Die B-Kette von Humaninsulin weist dabei die folgende Aminosäuresequenz auf:
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly
 Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr (SEQ ID NO 2).

5

Die Kristalle der Insulinanaloga der vorliegenden Erfindung enthalten ein
 Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben, in welchem
 Asparagin (Asn) in Position B3 der B-Kette durch eine natürlich auftretenden
 basischen Aminosäurerest ausgetauscht ist und wenigstens ein Aminosäurerest in
 10 den Positionen B27, B28 oder B29 der B-Kette durch einen anderen natürlich
 auftretenden Aminosäurerest ausgetauscht ist, wobei fakultativ Phenylalanin (Phe)
 in Position B1 der B-Kette fehlen kann.

15

Vorzugsweise ist das Insulinanalogon oder dessen physiologisch verträgliches Salz,
 gekennzeichnet durch Formel I



worin bedeuten

20

(A1-A5) die Aminosäurereste in den Positionen A1 bis A5 der A-Kette von
 Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 1) oder tierischem Insulin,

(A8-A10) die Aminosäurereste in den Positionen A8, A9 und A10 der A-Kette
 von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 1) oder tierischem Insulin,

25

(A12-A19) die Aminosäurereste in den Positionen A12 bis A19 der A-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 1) oder tierischem Insulin,

(B8-B18) die Aminosäurereste in den Positionen B8 bis B18 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 2) oder tierischem Insulin,

(B20-B26) die Aminosäurereste in den Positionen B20 bis B26 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 2) oder tierischem Insulin,

der Aminosäurerest in Position B30 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 2) oder tierischem Insulin,

B1 ein Phenylalaninrest (Phe) oder ein Wasserstoffatom,

B3 ein natürlich auftretender basischer Aminosäurerest,

B27, B28

und B29 die Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 2) oder tierischem Insulin oder

jeweils ein anderer natürlich auftretender Aminosäurerest, wobei wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette durch einen anderen natürlich vorkommenden Aminosäurerest ausgetauscht ist.

Von den zwanzig natürlich auftretenden Aminosäuren, die genetisch kodierbar sind, werden hier die Aminosäuren Glycin (Gly), Alanin (Ala), Valin (Val), Leucin (Leu), Isoleucin (Ile), Serin (Ser), Threonin (Thr), Cystein (Cys), Methionin (Met), Asparagin (Asn), Glutamin (Gln), Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr), Tryptophan (Trp) und Prolin (Pro) als neutrale Aminosäuren, die Aminosäuren Arginin (Arg), Lysin (Lys), und Histidin (His) als basische Aminosäuren und die Aminosäuren Asparaginsäure (Asp) und Glutaminsäure (Glu) als saure Aminosäuren bezeichnet.-

Vorzugsweise enthalten die Kristalle der Insulinanaloga der vorliegenden Erfindung ein Insulinanalogon von Rinderinsulin, Schweineinsulin, Schafinsulin oder Humaninsulin oder dessen physiologisch verträgliches Salz, nämlich ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz der Formel I, das sich

5 dadurch auszeichnet, daß

A8 Alanin (Ala),

A9 Serin (Ser),

A10 Valin (Val) und

10 B30 Alanin (Ala) bedeuten (Aminosäurereste A8 bis A10 und B30 des Rinderinsulins),

A8 Threonin (Thr),

A9 Serin (Ser) und

15 A10 Isoleucin (Ile) bedeuten (Aminosäurereste A8 bis A10 der Insuline von Mensch oder Schwein), wobei

B30 Alanin (Ala) (Aminosäurerest B30 von Schweineinsulin) oder

B30 Threonin (Thr) bedeutet (Aminosäurerest B30 von Humaninsulin, vgl. SEQ ID NO 2).

20 Besonders bevorzugt ist ein Insulinanaloga oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I mit den Aminosäureresten A8 bis A10 und B30 von Humaninsulin, welches sich ferner dadurch auszeichnet, daß

25 (A1-A5) die Aminosäurereste in den Positionen A1 bis A5 der A-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 1),

(A12-A19) die Aminosäurereste in den Positionen A12 bis A19 der A-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 1),

30 (B8-B18) die Aminosäurereste in den Positionen B8 bis B18 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 2) und

(B20-B26) die Aminosäurereste in den Positionen B20 bis B26 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 2) bedeuten.

Weitere bevorzugte Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung sind Kristalle

5 enthaltend ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B1 der B-Kette ein Phenylalaninrest (Phe) ist oder

ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel

10 I, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B3 der B-Kette ein Histidin- (His), Lysin- (Lys) oder Argininrest (Arg) ist.

Weitere bevorzugte Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung sind Kristalle

enthaltend ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben

15 der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette durch einen natürlich auftretenden Aminosäurerest ersetzt ist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe der neutralen oder der sauren Aminosäuren,

ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I,

dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein natürlich auftretender Aminosäurerest

ist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe Isoleucin (Ile), Asparaginsäure (Asp) und Glutaminsäure (Glu), vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer

25 der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 der B-Kette durch einen natürlich auftretenden Aminosäurerest ersetzt ist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe der neutralen Aminosäuren, oder besonders bevorzugt, daß wenigstens einer der

Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein Isoleucinrest (Ile) ist, oder

ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel

I, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den

Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein natürlich auftretender Aminosäurerest

ist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe der sauren Aminosäuren, vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein Asparaginsäurerest (Asp) ist, vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B27 oder B28 der B-Kette ein Asparaginsäurerest (Asp) ist, oder dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein Glutaminsäurerest (Glu) ist.

Eine bevorzugte Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung sind auch Kristalle enthaltend ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B29 der B-Kette ein Asparaginsäurerest (Asp) ist.

Weitere bevorzugte Ausgestaltungen sind Kristalle enthaltend ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B27 der B-Kette ein Glutaminsäurerest (Glu) ist,

ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B28 der B-Kette ein Glutaminsäurerest (Glu) ist, oder

ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B29 der B-Kette ein Glutaminsäurerest (Glu) ist.

Ganz besonders bevorzugt sind Kristalle enthaltend ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben, das sich dadurch auszeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr

aufweist (SEQ ID NO 3), oder

ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben, das sich dadurch auszeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B27 der B-Kette ein Isoleucinrest (Ile) ist, vorzugsweise ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben, das sich dadurch auszeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr

aufweist (SEQ ID NO 4), oder

ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B28 der B-Kette ein Isoleucinrest (Ile) ist, vorzugsweise ein Insulinanalogon oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben, das sich dadurch auszeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr

aufweist (SEQ ID NO 5).

Die Insulinanaloge der Formel I lassen sich vorzugsweise gentechnologisch herstellen.

Die Herstellung der Insulin der Formel I erfolgt hauptsächlich gentechnologisch mittels site-directed mutagenesis nach Standardmethoden.

Dazu wird eine für das gewünschte Insulinanalogon der Formel I kodierende Genstruktur konstruiert und in einer Wirtszelle - vorzugsweise in einem Bakterium wie E. coli oder eine Hefe, insbesondere Saccharomyces cerevisiae - zur Expression gebracht und -falls die Genstruktur für ein Fusionsprotein codiert - aus dem Fusionsprotein das Insulin-Analogon der Formel I freigesetzt; analoge

Methoden sind z.B. beschrieben in EP-A-0 211 299, EP-A-0 227 938, EP-A-0 229 998, EP-A-0 286 956 und der DE-Patentanmeldung P 38 21 159.

5 Die Abspaltung des Fusionsproteinanteils kann nach Zellaufschluß chemisch mittels Halogencyan (siehe EP-A-0 180 920) erfolgen.

Bei der Herstellung mittels eines Präproinsulinvorläufers der einen Fusionsproteinanteil (Präsequenz) nach US 5,358,857 besitzt, erfolgt die Abspaltung des Fusionsproteinanteils auf einer späteren Stufe zusammen mit der Abspaltung
10 des C-Peptides.

Der Insulinvorläufer wird dann der oxidativen Sulfityolyse nach der z.B. von R.C. Marshall und A.S. Inglis in "Practical Protein Chemistry - A Handbook" (Herausgeber A. Darbre) 1986, Seiten 49 - 53 beschriebenen Methode unterworfen und
15 anschließend in Gegenwart eines Thiols unter Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken renaturiert, z.B. nach der von G.H. Dixon und A.C. Wardlow in Nature (1960), Seiten 721 - 724 beschriebenen Methode.

Die Insulinvorläufer können jedoch auch direkt gefaltet werden (EP-A-0 600 372;
20 EP-A-0 668 292).

Das C-Peptid wird mittels tryptischer Spaltung entfernt - z.B. gemäß der Methode von Kemmler et al., J.B.C. (1971), Seiten 6786 - 6791 und das Insulinanalogon der Formel I mittels bekannter Techniken wie Chromatographie - z.B. EP-A-0 305 760 -
25 und Kristallisation gereinigt.

Bei diesen Verfahren endet die B-Kette C-terminal mit Arginin oder zwei Argininresten. Diese können enzymatisch mittels Carboxypeptidase B entfernt werden.

30

Die Insulinanaloge besitzen volle biologische Aktivität. Dies wurde durch intravenöse Applikation an Kaninchen und der daraus resultierenden Blutglucosesenkung gezeigt. Der schnellere Wirkungseintritt nach subcutaner Applikation wurde mit der

euglykämischen Clamp Technik am nüchternen Hund gezeigt (EP 0 885 961 A1, Beispiele 5 und 6). Es wurden 0,3 IE/kg verabreicht. Referenzpräparat war Humaninsulin. Bei der Clamptechnik wird nach der Insulininjektion in kurzen Zeitabständen der Blutglucosewert gemessen und genau soviel Glucose infundiert, um die Absenkung zu kompensieren. Dies hat den Vorteil, daß bei den Tieren keine Gegenregulation auftritt, wie es bei einem starken Abfall der Blutglucose nach der Gabe von Insulin der Fall wäre. Die Menge und der zeitliche Verlauf der infundierten Glucose charakterisieren die Wirkung des Insulins. Lys(B3), Glu(B29)- (SEQ ID NO 3) und Lys(B3), Ile(B28)- (SEQ ID NO 4) Insulin weisen einen deutlich schnelleren Wirkungseintritt als Humaninsulin auf. Die maximale Wirkung (Glucoseinfusionsrate) wird mit Humaninsulin nach 100 Minuten erreicht, mit Lys(B3), Glu(B29)-Insulin (SEQ ID NO 3) dagegen nach 80 Minuten und mit Lys(B3)-, Ile(B28)-Insulin (SEQ ID NO 4) bereits nach 60 Minuten. Daher sollten diese Analoga, wenn sie kurz vor einer Mahlzeit injiziert werden, den postprandialen Anstieg der Blutglucose besser kompensieren als Humaninsulin.

Die beschriebenen Insulinanaloga eignen sich sowohl zur Therapie des Typ I- als auch des Typ II-Diabetes mellitus vorzugsweise in Verbindung mit einem Basalinsulin.

Die Insulin-Analoga können in den pharmazeutischen Zubereitungen auch in Form deren physiologisch verträglichen Salze, als Alkali- oder als Ammoniumsalze, eingesetzt werden. Ein beliebiger Anteil eines oder mehrerer Insulin-Analoga der Formel I oder ein Insulin-Analogon der Formel I kann in einer Mischung weiterer dieser Insulin-Analoga unabhängig voneinander jeweils in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form vorliegen.

Insuline und Insulinanaloga werden häufig als wässrige pharmazeutische Formulierungen bereitgestellt, die Zinkionen enthalten.

Die Zugabe von Zinkionen zu Insulinpräparationen erfolgt im wesentlichen aus zwei Gründen:

1. Zn^{2+} -Ionen wirken stabilisierend auf Insulinpräparationen da diese die Bildung von Insulin-Hexameren fördern [Brange et al. *Diabetic Medicine*, 3, 532-536 (1986).
2. In Abhängigkeit von der Zn^{2+} -Ionen Konzentration kann der zeitliche Verlauf der An- und Abströmkinetik von Insulinpräparationen gesteuert werden.

5

Bei schnellwirkenden Insulinen führen die Punkte 1 und 2 zu einer Problematik. Aufgrund der erhöhten galenischen Stabilität der Präparation sind hohe Konzentrationen an Insulin-Hexameren vorteilhaft. Da Zn^{2+} -Ionen die An- und Abströmkinetik des Insulinanalogons jedoch verzögern, wirken Sie entgegengesetzt zur

10 gewünschten Kinetik der Wirkstoff-Freisetzung. Daher hat man sich entschieden, eines der beschriebenen Insulinanaloga, nämlich Lys B3, Glu B29-Humaninsulin, in Form einer zinkfreien, wässrigen Formulierung bereitzustellen (Internationale Patentanmeldung PCT/EP02/02625).

15 Zur Herstellung der zinkfreien, wässrigen Formulierung der beschriebenen Insulinanaloga, insbesondere Lys B3, Glu B29-Humaninsulin besteht das Bedürfnis, zinkfreie Kristalle der Insulinanaloga einsetzen zu können. Darüber hinaus können zinkfreie Kristalle der erfindungsgemäßen Insulinanaloga auch zur Herstellung anderer pharmazeutischer Formulierungen verwendet werden, z.B. bei festen

20 Formulierungen oder Emulsionen zur Verabreichung per Inhalator, oder bei oraler Verabreichung.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe war somit die Bereitstellung zinkfreier Kristalle der beschriebenen Insulinanaloga. Dabei sollte auch ein Ersatz von

25 Zinkionen durch andere zweiwertige Ionen, die für pharmazeutische Formulierungen aufgrund ihrer Toxizität ungeeignet sind, vermieden werden.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass die beschriebenen Insulinanaloga in Hexamer-Kristallen hergestellt werden können, die keine

30 zweiwertigen Ionen wie z.B. Zinkionen, enthalten. Am Beispiel des Insulinanalogons Lys B3, Glu B29-Humaninsulin sei dies näher erläutert.

Diese neue Kristallform von Lys B3, Glu B29-Humaninsulin ist kristallographisch isomorph zum klassischen 2Zn -Insulin-Typ der in der Literatur für Schweineinsulin

und Humaninsulin beschrieben ist [Baker et al., *Phil. Trans. Roy. Soc.* 319, 369-454(1988)]. Die neuen zinkfreien Hexamer-Kristalle gehören der rhomboedrischen Raumgruppe R3 (Nr. 146) an mit zwei Insulinmonomeren pro asymmetrischer Einheit. Die Elementarzellachsen bei -70°C (durch Anwendung der

- 5 Schockgefrieremethode) wurden ermittelt zu: $A = 81,5 \text{ \AA}$, $C = 33,3 \text{ \AA}$. Die Röntgenstrukturanalyse der neuen Kristallform bei $1,8 \text{ \AA}$ Auflösung ergab, dass sich an Stelle der Zn^{2+} -Ionen (im klassischen 2Zn-Typus) mit Bindungsabständen (Zn^{2+} -His-B10) um $2,0 \text{ \AA}$ in der neuen Kristallform von Lys B3, Glu B29-Humaninsulin nur ein sehr kleiner Elektronendichtepeak befindet der mit einem Wassermolekül (H_2O) entspricht (Bindungsabstand H_2O -His-B10 um $2,3 \text{ \AA}$). Sowohl die Quantität der Elektronendichte als auch der Bindungsabstand zeigen für ein Insulin mit Glutamat-B21-Seitenkette ein bisher unbekanntes strukturelles Arrangement der Region um die Histidin-B10-Seiten-kette.
- 15 Die (1σ -2Fo-Fc)-Elektronendichte der Region um Histidin B-10 ist signifikant unterschiedlich zum klassischen 2Zn-Typus, in welchem ein Zn^{2+} -Ion oktaedrisch von je drei Symmetrie-benachbarten Histindin-B10 und je drei Wassermolekülen koordiniert werden. Die Bindungsabstände (Zn^{2+} -His-B10) der in der PDB-Datenbank [Bernstein et al., *J.Mol.Biol.* 112, 535-542 (1977)] hinterlegten Strukturen des
- 20 2Zn-Typus liegen zwischen $1,9$ und $2,1 \text{ \AA}$ und sind signifikant unterschiedlich zu den beobachteten Bindungsabstände um $2,3\text{\AA}$ in der neuen, zinkfreien Kristallstruktur. Das besondere an der hier beschriebenen neuen Hexamer-Kristallform von Lys B3, Glu B29-Humaninsulin ist, dass diese Insulin-Hexamere enthält ohne die ansonsten hierfür notwendigen zweiwertigen Kationen (z.B. Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+}). Bisher hat man
- 25 angenommen, dass die Ausbildung von Insulin-Hexameren ohne zweiwertige Kationen nur dann möglich ist wenn die abstoßenden Kräfte der Glutamat-B21 Seitenkette durch Protein-Engineering (z.B. durch den Austausch von B21-Glu zu Gln) reduziert werden kann [Bentley et al., *J.Mol.Biol.* 228, 1163-1176 (1992). Die Beibehaltung der Glu-B21-Seitenkette - welche den Zerfall von Insulin-Hexameren
- 30 fördert - ist jedoch vor allem für schnellwirkende Insuline zum Erhalt einer schnellen An- und Abströmkinetik wichtig.

Gegenstand der Erfindung sind demgemäß Kristalle eines Insulinanalogons, in welchem Asparagin (Asn) in Position B3 der B-Kette durch einen natürlich auftretenden basischen Aminosäurerest ausgetauscht ist und wenigstens ein Aminosäurerest in den Positionen B27, B28 oder B29 der B-Kette durch einen anderen natürlich auftretenden neutralen oder sauren Aminosäurerest ausgetauscht ist, wobei fakultativ Phenylalanin (Phe) in Position B1 der B-Kette fehlen kann, wobei die Kristalle in der Raumgruppe R3 (Nr. 146) mit den Zellachsen $A=81,5 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ und $C=33,3 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ vorliegen; wobei insbesondere die Moleküle des Insulinanalogons in Form von zinkfreien Hexameren, bestehend aus jeweils drei Dimeren, vorliegen.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Kristalle wie oben beschrieben, wobei die Histidin B10-Reste jeweils dreier Moleküle des Insulinanalogons in einem Hexamer über Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Wassermolekül, einem Dihydrogenphosphat-Ion (H_2PO_4^-), einem Monohydrogenphosphat-Ion (HPO_4^{2-}) oder einem Sulfat-Ion (SO_4^{2-}) verbunden sind.

15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Kristalle wie oben beschrieben, wobei die Histidin B10-Reste der Moleküle des Insulinanalogons in einem Hexamer jeweils auf das eigene Dimer zurückgefaltet sind und keine Wasserstoffbrückenbildung der Histidin B10-Reste zu einem Wassermolekül vorhanden ist.

20

Die erfindungsgemäßen Kristalle enthalten dabei Insulinanaloga gemäß der oben beschriebenen Formel I, wobei insbesondere der Aminosäurerest in Position B3 der B-Kette des Insulinanalogons ein Histidin-(His), Lysin-(Lys) oder Argininrest (Arg) ist; und wobei besonders bevorzugt wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein natürlich auftretender Aminosäurerest ist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe Isoleucin (Ile), Asparaginsäure (Asp) und Glutaminsäure (Glu).

25

Die erfindungsgemäßen Kristalle enthalten dabei insbesondere ein Insulinanalogon dadurch gekennzeichnet, dass die B-Kette die Sequenz

30

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr

aufweist (SEQ ID NO 3).

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens einen Kristall wie oben beschrieben enthält, wobei bevorzugt ein Hilfsstoff enthalten sein kann, der die Aufnahme des Insulinanalogons ins Blut erleichtert und ganz besonders bevorzugt wobei die pharmazeutische Formulierung eine Insulinaktivität mit schnellem Wirkungseintritt
- 10 aufweist.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens einen Kristall wie oben beschrieben und einen Hilfsstoff enthält, der bei inhalativen und / oder oralen Formulierungen
- 15 von Insulin oder Insulinanaloga Anwendung findet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Kristalls wie oben beschrieben, bei dem

- (a) ein zinkfreies, amorphes Pulver eines Insulinanalogons wie oben
- 20 beschrieben in einer Konzentration von 15-25 mg/ml in Wasser gelöst wird,
- (b) eine Präzipitation mit einem geeigneten Präzipitanten erfolgt, und
- (c) die Kristalle isoliert und getrocknet werden;

- 25 wobei das Insulinanalogon insbesondere Lys B3, Glu B29-Humaninsulin ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Kristalls wie oben beschrieben, bei dem der Präzipitant ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend

- 30 (a) Ammoniumdihydrogenphosphat,
- (b) eine Kombination aus Ammoniumdihydrogenphosphat und Tri-Natriumcitrat; und

- (c) eine Kombination aus Ammoniumsulfat und Polyethylenglycol diverser Molekulargewichte;

wobei bevorzugt als Präzipitant Ammoniumdihydrogenphosphat oder Di-Ammoniumhydrogenphosphat bei pH Werten zwischen 3,0 und 8,0, oder Ammoniumdihydrogenphosphat/Di-Ammoniumhydrogenphosphat in Kombination mit Tri-Natriumcitrat bei einem pH-Wert von $5,5 \pm 1,5$ oder Ammoniumsulfat in Kombination mit PEG diverser Molekulargewichte bei einem pH-Wert von $6,0 \pm 1,5$ Anwendung findet.

10

Auch Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines Kristalls wie oben beschrieben zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Diabetes der Typen I und / oder II.

- 15 Die Erfindung wird anhand der Beispiele näher erläutert, ohne sich darauf zu beschränken.

Beispiel 1: Herstellung der neuen zinkfreien Hexamer-Kristallform:

- 20 Amorphes, zinkfreies Pulver von Lys B3, Glu B29-Humaninsulin wird ungepuffert in aqua dest./HCl bei pH um 2.0 gelöst. Dieses Vorgehen erlaubt, dass sich bei Insulinkonzentrationen um 20 mg/ml eine klare Lösung ausbildet. Die Kristallisation findet nach der Hanging-drop Methode in 24-well Linbro-Platten statt. Als Präzipitant wird das nachfolgende Reagens des „Protein Crystallization Screening Kit“ der
 25 Firma Hampton Research Inc. verwendet: 1. 0,4 M Ammoniumdihydrogenphosphat, pH 4,2.

Beispiel 2: Herstellung der neuen zinkfreien Hexamer-Kristallform:

- 30 Amorphes, zinkfreies Pulver von Lys B3, Glu B29-Humaninsulin wird ungepuffert in aqua dest./HCl bei pH um 2.0 gelöst. Dieses Vorgehen erlaubt, dass sich bei Insulinkonzentrationen um 20 mg/ml eine klare Lösung ausbildet. Die Kristallisation findet nach der Hanging-drop Methode in 24-well Linbro-Platten statt. Als Präzipitant

wird das nachfolgende Reagens des „Protein Crystallization Screening Kit“ der Firma Hampton Research Inc. verwendet: 1 M Ammoniumdihydrogenphosphat, 0,1 M Tri-Natriumcitrat, pH 5,6.

5 Beispiel 3: Herstellung der neuen zinkfreien Hexamer-Kristallform:

Amorphes, zinkfreies Pulver von Lys B3, Glu B29-Humaninsulin wird ungepuffert in aqua dest./HCl bei pH um 2.0 gelöst. Dieses Vorgehen erlaubt, dass sich bei Insulinkonzentrationen um 20 mg/ml eine klare Lösung ausbildet. Die Kristallisation
10 findet nach der Hanging-drop Methode in 24-well Linbro-Platten statt. Als Präzipitant wird das nachfolgende Reagens des „Protein Crystallization Screening Kit“ der Firma Hampton Research Inc. verwendet: 0,2 M Ammoniumsulfat, 20% PEG 3350, pH 6,0.

15 Beispiel 4: Röntgenstrukturanalyse

Die gemäß der Beispiele 1 – 3 erhaltenen Kristalle sind wohl geordnet und ermöglichen eine Röntgenstrukturanalyse, welche für ein Insulin mit Glutamat-B21-Seitenkette ein bisher unbekanntes strukturelles Arrangement der Region um die
20 Histidin-B10-Seitenkette aufzeigt.

Zinkhaltige Humaninsulin-Kristalle des 2Zn-Typus weisen als Raumgruppe R3 (146) und Zellachsen von $A=82.5$, $C=34.0$ Å auf. Zinkfreie Kristalle der Verbindung I sind isomorph und weisen typischerweise Zellachsen von $A=81.5$, $C=33.3$ Å auf. Die
25 Insulinmoleküle in der zinkhaltigen Kristallstruktur von Humaninsulin und der zinkfreien Kristallstruktur von Lys B3, Glu B29-Humaninsulin im sogenannten T_6 - bzw. 2Zn-Typus gefaltet. Im 2Zn-Insulin (T_6) liegen alle 6 Monomere im sogenannten T = tensed Zustand vor. Der N-Terminus der B-Ketten ist ausgesteckt ohne signifikantes Sekundärstrukturmerkmal, es liegt keine α -Helix-Sekundärstruktur
30 wie im alternativen R-Zustand vor. Signifikante Unterschiede in den Kristallstrukturen von Humaninsulin und der Verbindung I ergeben sich im Arrangement der Region um die Histidin-B10-Seitenkette.

Für alle Herstellungsmethoden gemäß der Beispiele 1 – 3 liegen hochauflösende Einkristall Röntgenstrukturanalysen vor, die den zinkfreien Zustand dieser Insulinhexamer-Kristalle beweisen. Als Elementarzellachsen und Kristallsymmetrie wurde bestimmt:

5

Herstellungsverfahren 1: $A=81.52$, $C=33.31$ Å, R3 (Raumgruppe Nr. 146)

Herstellungsverfahren 2: $A=81.51$, $C=33.43$ Å, R3 (Raumgruppe Nr. 146)

Herstellungsverfahren 3: $A=81.38$, $C=33.22$ Å, R3 (Raumgruppe Nr. 146).

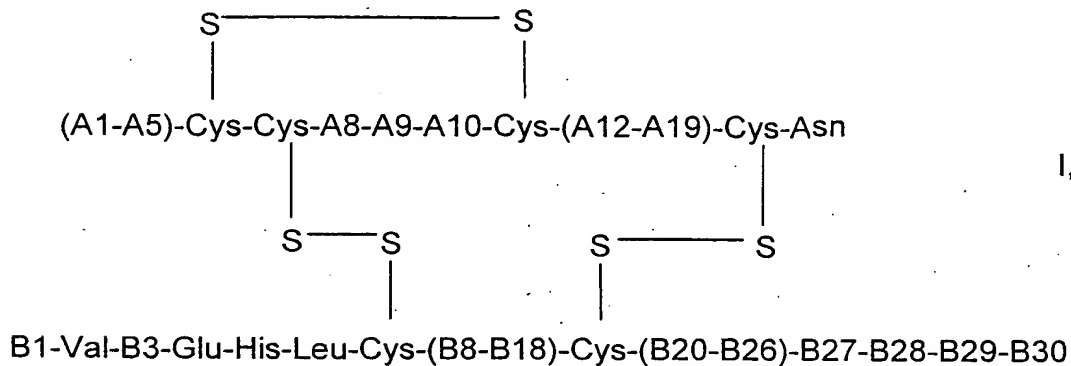
10

Patentansprüche

1. Kristalle eines Insulinanalogons, in welchem Asparagin (Asn) in Position B3 der B-Kette durch einen natürlich auftretenden basischen Aminosäurerest
 5 ausgetauscht ist und wenigstens ein Aminosäurerest in den Positionen B27, B28 oder B29 der B-Kette durch einen anderen natürlich auftretenden neutralen oder sauren Aminosäurerest ausgetauscht ist, wobei fakultativ Phenylalanin (Phe) in Position B1 der B-Kette fehlen kann, wobei die Kristalle in der Raumgruppe R3 (Nr. 146) mit den Zellachsen $A=81,5 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ und $C= 33,3 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ vorliegen.
- 10 2. Kristalle gemäß Anspruch 1, wobei die Moleküle des Insulinanalogons in Form von zinkfreien Hexameren, bestehend aus jeweils drei Dimeren, vorliegen.
3. Kristalle gemäß Anspruch 2, wobei die Histidin B10-Reste jeweils dreier
 15 Moleküle des Insulinanalogons in einem Hexamer über Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Wassermolekül verbunden sind.
4. Kristalle gemäß Anspruch 2, wobei die Histidin B10-Reste jeweils dreier Moleküle des Insulinanalogons in einem Hexamer über
 20 Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Dihydrogenphosphat-Ion (H_2PO_4^-) verbunden sind.
5. Kristalle gemäß Anspruch 2, wobei die Histidin B10-Reste jeweils dreier Moleküle des Insulinanalogons in einem Hexamer über
 25 Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Monohydrogenphosphat-Ion (HPO_4^{2-}) verbunden sind.
6. Kristalle gemäß Anspruch 2, wobei die Histidin B10-Reste jeweils dreier Moleküle des Insulinanalogons in einem Hexamer über
 30 Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Sulfat-Ion (SO_4^{2-}) verbunden sind.
7. Kristalle gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Histidin B10-Reste der Moleküle des Insulinanalogons in einem Hexamer jeweils auf

das eigene Dimer zurückgefaltet sind und keine Wasserstoffbrückenbildung der Histidin B10-Reste zu einem Wassermolekül vorhanden ist.

8. Kristalle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Insulinanalogon eine
5 Verbindung der Formel I ist,



worin bedeuten

10

(A1-A5) die Aminosäurereste in den Positionen A1 bis A5 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,

15

(A8-A10) die Aminosäurereste in den Positionen A8, A9 und A10 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,

20

(A12-A19) die Aminosäurereste in den Positionen A12 bis A19 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,

25

(B8-B18) die Aminosäurereste in den Positionen B8 bis B18 der B-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,

(B20-B26) die Aminosäurereste in den Positionen B20 bis B26 der B-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,

30

(B30) der Aminosäurerest in Position B30 der B-Kette von Humaninsulin tierischem Insulin,

B1 ein Phenylalaninrest (Phe) oder ein Wasserstoffatom,

B3 ein natürlich auftretender basischer Aminosäurerest,

5

B27, B28

und B29 die Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin oder jeweils ein anderer natürlich auftretender Aminosäurerest, wobei wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette durch einen anderen natürlich auftretenden Aminosäurerest ausgetauscht ist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe der neutralen oder sauren Aminosäuren.

10

15 9. Kristalle nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Aminosäurerest in Position B3 der B-Kette des Insulinanalogons eine Histidin-(His), Lysin-(Lys) oder Argininrest (Arg) ist.

20 10. Kristalle nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein natürlich auftretender Aminosäurerest ist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe Isoleucin (Ile), Asparaginsäure (Asp) und Glutaminsäure (Glu).

25 11. Kristalle nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die B-Kette die Sequenz

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu
Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr

30

aufweist (SEQ ID NO 3).

12. Pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens einen Kristall nach einem der Ansprüche 1 bis 11 enthält.

13. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass sie ferner einen Hilfsstoff enthält, der die Aufnahme des Insulinanalogons ins Blut erleichtert.

14. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens einen Kristall nach einem der Ansprüche 1 bis 11 und einen Hilfsstoff enthält, der bei inhalativen und / oder oralen Formulierungen von Insulin oder Insulinanaloga Anwendung findet.

15. Verwendung eines Kristalls gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, welche eine Insulinaktivität mit schnellem Wirkungseintritt aufweist.

16. Verfahren zur Herstellung eines Kristalls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, bei dem

- (d) ein zinkfreies, amorphes Pulver eines Insulinanalogons gemäß der Ansprüche 1 bis 11 in einer Konzentration von 15-25 mg/ml in Wasser gelöst wird,
- (e) eine Präzipitation mit einem geeigneten Präzipitanten erfolgt, und
- (f) die Kristalle isoliert und getrocknet werden.

17. Verfahren gemäß Anspruch 16, wobei das Insulinanalogon Lys B3, Glu B29-Humaninsulin ist.

18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 oder 17, bei dem der Präzipitant ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend

- (d) Ammoniumdihydrogenphosphat,
- (e) eine Kombination aus Ammoniumdihydrogenphosphat und Tri-Natriumcitrat; und

- (f) eine Kombination aus Ammoniumsulfat und Polyethylenglycol diverser Molekulargewichte.

19. Verfahren zur Herstellung der Kristalle gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1, 2, 4, 5 und 7 bis 11 nach einem Verfahren gemäß Anspruch 18, wobei als Präzipitant Ammoniumdihydrogenphosphat oder Di-Ammoniumhydrogenphosphat bei pH Werten zwischen 3,0 und 8,0 Anwendung findet.
20. Verfahren zur Herstellung der Kristalle gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 nach einem Verfahren gemäß Anspruch 18, wobei als Präzipitant entweder Ammoniumdihydrogenphosphat/Di-Ammoniumhydrogenphosphat in Kombination mit Tri-Natriumcitrat bei einem pH-Wert von $5,5 \pm 1,5$ oder Ammoniumsulfat in Kombination mit PEG diverser Molekulargewichte bei einem pH-Wert von $6,0 \pm 1,5$ Anwendung findet.
21. Verwendung eines Kristalls nach einem der Ansprüche 1 – 11 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Diabetes der Typen I und / oder II.

Zusammenfassung

5 Kristalle von Insulinanaloga und Verfahren zu ihrer Herstellung

Die Erfindung betrifft Kristalle eines Insulinanalogons, in welchem Asparagin (Asn) in Position B3 der B-Kette durch einen natürlich auftretenden basischen Aminosäurerest ausgetauscht ist und wenigstens ein Aminosäurerest in den

- 10 Positionen B27, B28 oder B29 der B-Kette durch einen anderen natürlich auftretenden neutralen oder sauren Aminosäurerest ausgetauscht ist, wobei fakultativ Phenylalanin (Phe) in Position B1 der B-Kette fehlen kann, wobei die Kristalle in der Raumgruppe R3 (Nr. 146) mit den Zellachsen $A=81,5 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ und $C=33,3 \text{ \AA} \pm 1 \text{ \AA}$ vorliegen, ihre Herstellung und Verwendung sowie eine
- 15 pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend diese Kristalle.